1966

THESIS

ERLANGEN

Der Einfluß halogenierter Alkohole und Aldehyde auf den Gehalt der Leber an transacetylierendem Coenzym A

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.

von

Georg Fickeis

aus Duisburg

1966 F242

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. F. Heim

Der Einfluß halogenierter Alkohole und Aldehyde auf den Gehalt der Leber an transacetylierendem Coenzym A

Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

Vorgelegt von
Georg F i c k e i s
aus
Duisburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. K. Ober

Referent: Prof. Dr. F. Heim

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1966

Herrn Prof. Dr. F.Heim möchte ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit sehr danken

Coenzym A ist ein in allen Körperzellen vorkommendes Coenzym, das im Stoffwechsel der Zelle eine zentrale Stellung einnimmt. Es überträgt Essigsäure und andere Carbonsäuren. Die an Coenzym A gebundenen Säuren besitzen ein hohes Gruppenübertragungspotential. Der Aufbau des Coenzym A ist kompliziert. Es enthält Pantothensäure, Adenin-3,5-diphosphat und eine zu einem Cysteaminanteil gehörige SH-Gruppe, an die die Säurereste gebunden werden. Chemisch gesehen liegen sie also als Thioester vor, und man weiß, daß Thioester sehr rekationsfähig sind. Bei der Hydrolyse werden etwa 8 Cal an chemischer Energie frei.

Die wohl wichtigste Coenzym A-Verbindung ist das Acetyl-Coenzym A, auch als aktivierte Essigsäure bezeichnet. Die Reaktionen der aktivierten Essigsäure lassen sich in 2 Gruppen einteilen, 1. Reaktionen der Carboxylgruppe und 2. Reaktionen der Methylgruppe des Acetatrestes. Wichtige Reaktionen der 1. Gruppe sind die Übertragung des Acetylanteils auf das Cholin unter Bildung von Acetylcholin und die Reaktion von 2 Molekülen Acetyl-Coenzym A unter Bildung von Acetessigsäure. Unter den Reaktionen der 2. Gruppe bildet die Übertragung des Acetylrestes vom Coenzym A auf Oxalacetat unter Bildung von Zitronensäure eine große Rolle. Diese Reaktion nimmt eine Schlüsselstellung im Energiestoffwechsel der Zelle deshalb ein, weil alle Energie liefernden Nahrungsbestandteile, also Kohlenhydrate, Fette und Eiweißkörper, bei ihrem Abbau Acetyl-Coenzym A liefern und der Acetylrest in den Zitronensäurezyklus eingeschleust wird, an den sich schließlich die Endoxydation des Acetats zu CO_2 und H_2O durch die Enzyme der Atmungskette anschließt. Wenn wir von der geringen Energiegewinnung beim glykolytischen Abbau der Kohlenhydrate und der Bildung von chemischer Energie bei der Oxydation der Glucose über den

Pentosephosphatzyklus absehen, wird alle Energie der Zelle auf einem Wege gewonnen, der über die aktivierte Essigsäure, also über die Acetyl-Coenzym A-Verbindung führt. Daneben spielt selbstverständlich das Coenzym A auch bei anderen chemischen Reaktionen, so z.B. beim Auf- und Abbau der Fettsäuren, bei Entgiftungsreaktionen u.a., eine große Rolle.

Im Rahmen von Untersuchungen über die Wirkungen des Äthylalkohols auf den Stoffwechsel des Zentralnervensystems und der Leber wurde beobachtet, daß nichtletale Dosen von Äthanol nach intravenöser oder peroraler Verabreichung zu einer von der Dosis und somit von der Höhe der Blutalkoholkonzentration abhängigen Inaktivierung des Coenzym A führen, die bis zu 90% beträgt (Ammon, Estler). Die Coenzym A-Inaktivierung wird von diesen Autoren nicht auf den Alkohol selbst, sondern auf den bei dessen Abbau entstehenden Acetaldehyd zurückgeführt, und zwar bildet der Aldehyd mit der funktionellen Gruppe des Coenzym A ein Semimercaptal, durch das die SH-Gruppe blockiert und das Coenzym seiner transacetylierenden Eigenschaften beraubt wird.

Nachdem von M. Wagner neben Äthanol Methanol und Propanol sowie die diesen Alkoholen zugehörigen Aldehyde Formaldehyd, Acetaldehyd und Propionaldehyd, sowie einige andere niedere Aldehyde auf ihren die Coenzym A-Aktivität der Leber inaktivierenden Einfluß hin geprüft worden waren, untersuchten wir in vorliegender Arbeit einige halognierte Alkohole und die zugehörigen Aldehyde, da die Möglichkeit besteht, daß die Coenzym A-hemmenden Eigenschaften der Alkohole bzw. ihrer Aldehyde durch Halogenierung gewisse Änderungen erfahren. Außerdem könnten die Versuchsergebnisse eventuelle Hinweise dafür geben, ob ähnlich wie beim Äthylalkohol auch die Inaktivierung des Coenzym A

nach Verabreichung halogenierter Alkohole auf der intermediären Bildung der entsprechenden Aldehyde beruht.

Methodik

Die Versuche wurden an weißen männlichen Mäusen des Stammes NMRI, die bei einer Raumtemperatur von 24° C und Standardkost Altromin gehalten wurden, durchgeführt. Die Versuchssubstanzen wurden als wässrige Lösungen intravenös injiziert, wobei die injizierte Flüssigkeitsmenge 0,01 ml/g Körpergewicht nicht überschritt. Die Injektionsdauer betrug 2-6 min. Das Ende der Injektion stellt in den Abbildungen den Zeitpunkt 0 dar. Zu verschiedenen Zeiten nach Ende der Injektion wurden die Tiere durch Eintauchen in flüssige Luft getötet und die Lebern in gefrorenem Zustand herauspräpariert. Die Coenzym A-Bestimmung erfolgte nach der von Tabor und Mitarb. modifizierten Methode von Kaplan und Lipmann, die auf der Acetylierung von p-Nitroanilin durch Coenzym A und der anschließenden kolorimetrischen Bestimmung des nicht-acetylierten p-Nitroanilin beruht.

Bereitung des Organkochsaftes: 1 Teil gefrorene Leber wird mit 9 Teilen siedendem Wasser übergossen, homogenisiert, 3 min in siedendem Wasserbad gehalten und anschließend sofort zur Abkühlung in ein Eisbad gebracht. Anschließend wird 20 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Vom Überstand werden 0,1 ml in den Test eingesetzt.

Bei der Bestimmung des Coenzym A-Gehaltes wurde im einzelnen wie folgt verfahren: In Kunststoffzentrifugenbecher werden folgende Lösungen pipettiert:

0,02 ml einer frischbereiteten m-$NaHCO_3$-Lösung

0,05 ml 0,11 m Glutathion (reduziert)

0,07 ml Reaktionsgemisch: 6 ml 0,06 m ATP, 6 ml 0,2 m Natr.citric., 0,75 ml m Natr.acetic.

0,12 ml 0,0025 m p-Nitroanilin
0,1 ml der auf Coenzym A zu untersuchenden Flüssigkeit (Organkochsaft)
0,064 ml gealtertes Taubenleberferment
Die Becher werden mit Gummistopfen verschlossen und 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad incubiert. Im Anschluß daran wird in jeden Becher 1 ml einer 5%igen Trichloressigsäure gegeben. Der entstandene Niederschlag wird 5 min bei 10000 U/min abzentrifugiert und der Überstand in bereitgestellte, nummerierte Reagenzgläser gegossen und im PMQ II-Photometer (Fa. Carl Zeiss) bei 400 mμ in einer 1 cm-Küvette gemessen.

Aufstellung der Eichkurve: Es wurde dazu eine wässrige Lösung von Coenzym A verwendet, die 50 γ 75%iges Coenzym A in ml enthält. In aufsteigender Reihe werden zwischen 0,45 und 2,7 γ Coenzym A zu den Testansätzen gegeben. Die erhaltenen Extinktionswerte werden als Kurve aufgetragen und anhand dieser Kurve die unbekannten Coenzym A-Werte aus den Organkochsäften abgelesen. Das Taubenleberferment, das das für den Test wichtige Fermentsystem enthält, wurde nach Angaben von Lynen und Mitarb. hergestellt.

Die Anzahl der Versuchstiere, aus denen sich die jeweiligen Mittelwerte zusammensetzen, betrug 10-15. Die Unterschiede der Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen gegenüber den Kontrolltieren wurden mit Hilfe des t-Testes überprüft. Sie wurden als signifikant angesehen, wenn $P \leq 0{,}05$.

Versuchsergebnisse

1. Monochloräthanol und Monochloracetaldehyd

Wie aus der Abb. 1 hervorgeht, kommt es bereits 5 min nach der intravenösen Verabreichung von 40 µMol/g Monochloräthanol zu einer Abnahme der Coenzym A-Aktivität in der Leber um 15%. Diese Dosis entspricht 50% der LD_{50}. Auch nach 10, 30, 60 und 120 min ist die Coenzym A-Aktivität in der Leber gegenüber den Kontrollen noch signifikant erniedrigt.

Neben der Dosis von 40 µMol/g wurden kleinere und größere Mengen Monochloräthanol hinsichtlich ihres Einflusses auf die Coenzym A-Aktivität in der Leber 60 min nach intraperitonealer Verabreichung untersucht (Abb. 2). Die Abhängigkeit der Wirkung von der Dosis ist innerhalb des Bereichs von 20-70 µMol/g sehr gering.

Monochloracetaldehyd setzt, wie aus Abb. 1 hervorgeht, bereits in einer Dosierung von 1 µMol/g - sie entspricht 50% der LD_{50} - die Coenzym A-Aktivität innerhalb der ersten 10 min um 21% herab. Nach 30 min ist der Coenzym A-Gehalt der Leber noch vermindert, nach 60 min wieder normal.

2. Trichloräthanol und Trichloracetaldehydhydrat (Chloralhydrat)

Obwohl in unseren Versuchen (Abb. 1) die verabreichten Mengen von 2 µMol/g Trichloräthanol 2/3 der LD_{50} dieser Substanz betrugen, ist der hemmende Einfluß auf die Coenzym A-Aktivität der Leber sehr gering und von sehr kurzer, etwa 10 min Dauer. Abbildung 2 bringt die Dosis-Wirkungskurve von 1-4 µMol/g Trichloräthanol, wobei die Wirkung auf die Coenzym A-Aktivität 60 min nach der intraperitonealen Verabreichung der Substanz bestimmt wurde. Wie die Abbildung zeigt, ist durch eine Steigerung der Dosis

über 2 µMol/g hinaus eine Wirkungssteigerung nicht mehr zu erzielen.

Aus Abb. 1 geht hervor, daß Mengen von 4 µMol/g Trichloracetaldehydhydrat ohne Einfluß auf die Coenzym A-Aktivität der Leber sind. 4 µMol/g sind bereits 75% der LD_{50}.

3. Tribromäthanol (Avertin)

Dieser bromierte Alkohol besitzt, wie aus Abb. 1 hervorgeht, in einer Dosis von 1,5 µMol/g - sie entspricht 75% der LD_{50} - keine Hemmwirkung gegenüber dem Coenzym A der Leber.

Diskussion

Verglichen mit Äthanol, zeigt Monochloräthanol nach intravenöser Injektion eine schwächere Coenzym A-Hemmung. Doch setzt die Wirkung früher ein und ist auffallend lang. Der zugehörige Monochloracetaldehyd ist etwa 40 mal wirksamer als Monochloräthanol, während Acetaldehyd nur etwa 2,5 mal wirksamer ist als Äthanol. Die Wirkungsdauer des Monochloracetaldehyd ist auf etwa 30 min begrenzt. Er übertrifft also hinsichtlich Wirkungsintensität und -dauer den Acetaldehyd beträchtlich.

Von Ammon, Estler und Heim konnte gezeigt werden, daß Äthanol selbst die Coenzym A-Aktivität nicht hemmt und erst der beim Abbau des Alkohols entstehende Acetaldehyd durch Bildung eines Semimercaptals die funktionelle SH-Gruppe des Coenzym A blockiert. Die Ergebnisse unserer Versuche mit monochloriertem Äthanol und Acetaldehyd scheinen dafür zu sprechen, daß hier der gleiche Wirkungsmechanismus wie beim Äthanol-Acetaldehyd vorliegt. Nach Beendigung der intravenösen Zufuhr des Monochloräthanol tritt sehr wahrscheinlich in der Leber eine enzymatische Oxydation

des Alkohols zum Aldehyd ein, der dann durch Bildung eines Semimercaptals die SH-Gruppe des Coenzym A blockiert.

Für die Annahme, daß nicht der Alkohol selbst, sondern der Aldehyd die Coenzym A-hemmenden Eigenschaften besitzt, spricht 1., daß der Aldehyd 40 mal wirksamer ist als der Alkohol und 2., daß, wie Abb. 2 zeigt, durch Steigerung der Alkoholmengen die Coenzym A-hemmende Wirkung des Alkohols nicht zunimmt. Eine Wirkungssteigerung wäre bei Dosiserhöhung zu erwarten, wenn der Alkohol selbst das Coenzym A blockieren würde. Da, wie bekannt ist, beim Alkoholabbau in der Leber die Aktivität der Alkoholdehydrogenase den begrenzenden Schritt darstellt, so kann, wenn der Aldehyd die Coenzym A-hemmende Substanz ist, durch Steigerung der Alkoholdosen, wenn die maximale Umsatzkapazität der Alkoholdehydrogenase erreicht ist, die Wirkung nicht weiter verstärkt werden. Die nahezu gleichbleibende, über 2 Stunden anhaltende Coenzym A-Blockierung nach der intravenösen Injektion des Monochloräthanol weist ebenfalls darauf hin, daß der Alkohol sehr langsam oxydiert wird, also ein Depot darstellt, aus dem in der Zeiteinheit für die Hemmung des Coenzym A ausreichende Mengen des Aldehyd entstehen.

Die Coenzym A-hemmende Wirkung des Trichloräthanol nach einer intravenösen Dosis von 2 µMol/g, die bereits 2/3 der LD_{50} beträgt, ist sehr schwach und nur von 10 min Dauer.

Trichloracetaldehydhydrat, das Reaktionsprodukt aus Trichloracetaldehyd und Wasser, ist ohne Coenzym A-hemmende Wirkung. Die Frage, warum Trichloracetaldehydhydrat im Gegensatz zum Acetaldehyd und Monochloracetaldehyd Coenzym A nicht hemmt, ist folgendermaßen zu beantworten. Trichloracetaldehyd ist in Gegenwart von Wasser nicht beständig. Es bildet sofort Trichloracet-

aldehydhydrat, eine Verbindung, die nicht alle Aldehydreaktionen gibt, und die offenbar auch nicht imstande ist, mit der SH-Gruppe des Coenzym A ein Semimercaptal zu bilden. Daß trotzdem nach der intravenösen Injektion von Trichloräthanol eine geringe Hemmung des Coenzym A zu beobachten ist, ist vermutlich damit zu erklären, daß intermediär in der Leber bei der enzymatischen Dehydrierung des Trichloräthanol kleine Mengen des nicht hydrierten Trichloracetaldehyds entstehen, die offenbar zur Hemmung des Coenzym A befähigt sind, doch rasch in das unwirksame Trichloracetaldehydhydrat umgewandelt werden.

Wie aus Abb. 2 hervorgeht, ist nach intraperitonealer Verabreichung von 1-4 µMol/g Trichloräthanol noch nach 60 min eine Coenzym A-hemmende Wirkung zu beobachten. Doch ist hierbei zu berücksichtigen, daß nach intravenöser Injektion sich die verabreichte Menge rasch und gleichmäßig über den gesamten Organismus verteilt, während nach intraperitonealer Verabreichung die gesamte injizierte Alkoholmenge über den Pfortaderkreislauf die Leber erreicht und somit der Alkohol wahrscheinlich über eine längere Zeit hin eine höhere Konzentration in der Leber erreicht als nach intravenöser Zufuhr. Auch die Tatsache, daß durch Steigerung der Trichloräthanoldosis von 2 auf 3 und 4 µMol/g eine Wirkungssteigerung nicht zu erzielen ist (Abb. 2), deutet darauf hin, daß es nicht der Alkohol selbst sein kann, sondern ein intermediär entstehendes Abbauprodukt sein muß, das die Coenzym A-Hemmung bewirkt.

Tribromäthanol ist ein halogenierter Alkohol, der weder selbst Coenzym A-hemmend wirkt, noch auch ein Abbauprodukt liefert, das das Coenzym A blockiert. Eine nachweisbare Bildung von Tribromacetaldehyd findet nach Angaben von Möller, Sollmann, Goodman

and Gilman nicht statt.

Die Befunde mit Monochloräthanol und Monochloracetaldehyd sowie mit Trichloräthanol und Trichloracetaldehydhydrat sprechen dafür, daß der Coenzym A-hemmende Mechanismus beider chlorierter Alkohole der gleiche ist wie beim Äthanol. Auch die chlorierten Alkohole besitzen offenbar keine direkten Coenzym A-hemmenden Eigenschaften. Zur Hemmung des Coenzym A kommt es erst dann, wenn intermediär aus dem Alkohol ein Aldehyd mit Coenzym A-hemmenden Eigenschaften entsteht. Die Hydratisierung der Aldehydgruppe, wie dies beim Trichloracetaldehydhydrat der Fall ist, verhindert die Bildung eines Semimercaptals, so daß nach Verabreichung einer wässrigen Lösung von Trichloracetaldehydhydrat keine Coenzym A-Hemmung zustande kommt. Da wahrscheinlich in der Leber aus Trichloräthanol primär der wasserfreie Trichloracetaldehyd entsteht, der dann in statu nascendi mit der SH-Gruppe des Coenzym A reagiert, wird das Coenzym blockiert, soweit nicht sofort aus dem Aldehyd das unwirksame Trichloracetaldehydhydrat entsteht.

Zusammenfassung

Es wurde der Einfluß halogenierter Alkohole und Aldehyde, und zwar des Monochloräthanol, des Monochloracetaldehyd, des Trichloräthanol und des Trichloracetaldehydhydrat sowie des Tribromäthanol nach intravenöser und intraperitonealer Verabreichung auf die Coenzym A-Aktivität der Leber weißer Mäuse untersucht und mit dem des Äthanol und Acetaldehyd verglichen. Um eine signifikante Änderung der Coenzym A-Aktivität zu erzielen, mußten die Verbindungen in bereits toxisch wirkenden Dosen verabreicht werden.

Der Monochloracetaldehyd ist hinsichtlich seines die Coenzym A-Aktivität hemmenden Einflusses etwa 40 mal wirksamer als der entsprechende Alkohol Monochloräthanol. Trichloracetaldehydhydrat dagegen ist unwirksam. Die Coenzym A-hemmende Wirkung des Trichloräthanol ist gering und nach intravenöser Injektion von sehr kurzer Dauer. Beim Tribromäthanol fehlt ein hemmender Effekt auf das Coenzym A.

Aus den Ergebnissen der Versuche kann geschlossen werden, daß ganz ähnlich wie beim Äthanol auch seine halogenierten Derivate nicht selbst die funktionelle SH-Gruppe des Coenzym A blockieren, sondern die beim intermediären Abbau der Alkohole in der Leber entstehenden Aldehyde. Trichloracetaldehydhydrat ist deshalb unwirksam, weil die Hydratisierung der Aldehydgruppe die Semimercaptalbildung mit der SH-Gruppe des Coenzym A verhindert.

Literatur

H.P.T. Ammon, C.-J. Estler u. F. Heim:
Der Einfluß von Äthylalkohol auf den Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel des Gehirns weißer Mäuse
Arch.int.Pharmacodyn. 154, 108, 1965

H.P.T. Ammon, C.-J. Estler u. F. Heim:
Akute Äthanolvergiftung und Leberstoffwechsel
Arch.int.Pharmacodyn. 159, 258, 1966

F. Heim, H.P.T. Ammon, C.-J. Estler u. D. Mikschiczek:
Funktion und Stoffwechsel des Gehirns unter der Einwirkung von niederen Alkoholkonzentrationen
Med.Pharmakol.exp. 13, 361, 1965

H.P.T. Ammon:
Zum Mechanismus der Coenzym A-Inaktivierung nach Verabreichung von Äthanol
Naunyn.Schmiedebergs Arch. exp.Path.u.Pharmak. 251, 114, 1965

M.O. Kaplan and F. Lipmann:
The assay and distribution of coenzyme A
J.biol.chem. 174, 37, 1948

H. Tabor, A. Mehler and E. Stadtmann,
J.biol.chem. 207, 127, 1953

M. Wagner:
Der Einfluß aliphatischer Alkohole und Aldehyde auf den Gehalt der Leber an transacetylierendem Co A (unveröff.)

L.S. Goodman and A. Gilman:
The Pharmacological basis of Theraupeutics
The Macmillan Company New York 1965

T. Sollmann:
A Manual of Pharmacology
W.B. Saunders Company Philadelphia-London 1957

K.O. Möller:
Pharmakologie
Benno Schwabe & Co. Basel (Stuttgart 1961)

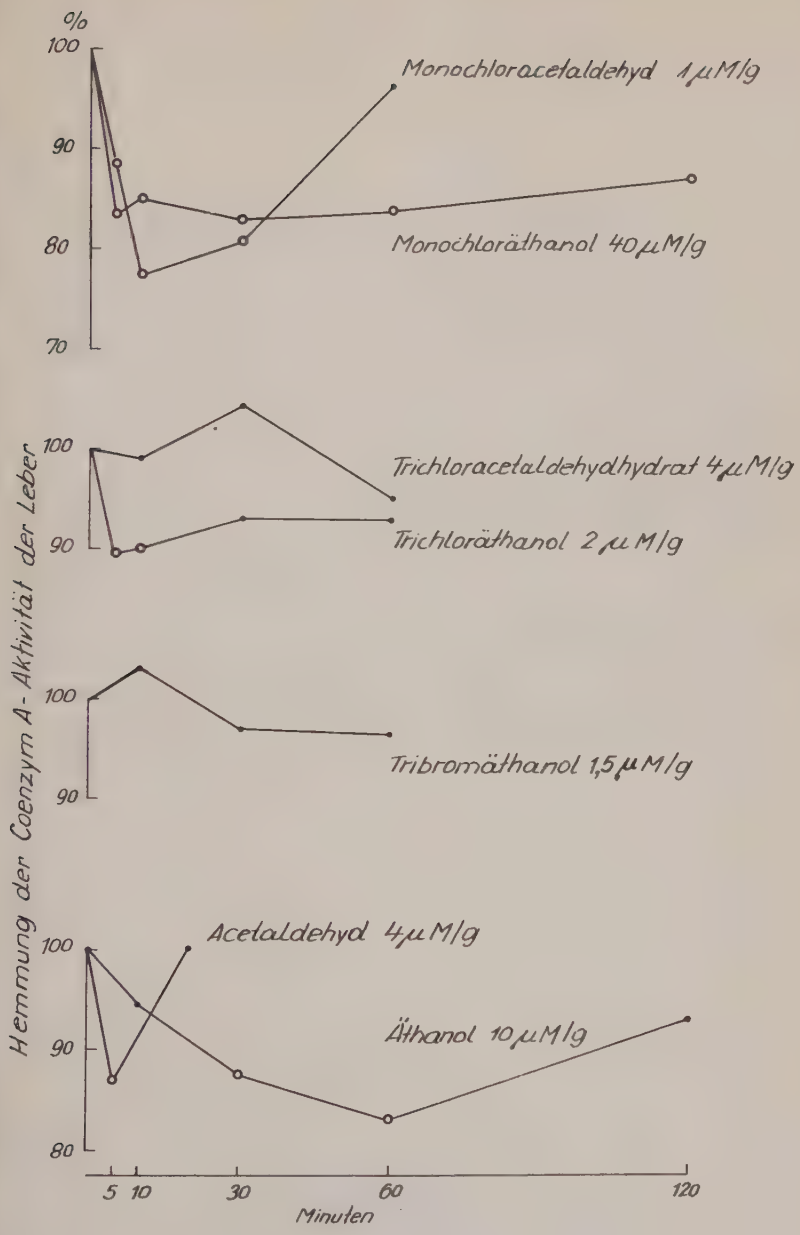
%
100
90
80
70
Monochloracetaldehyd 1 µM/g
Monochloräthanol 40 µM/g
100
90
Trichloracetaldehydhydrat 4 µM/g
Trichloräthanol 2 µM/g
100
90
Tribromäthanol 1,5 µM/g
Hemmung der Coenzym A - Aktivität der Leber
100
90
80
Acetaldehyd 4 µM/g
Äthanol 10 µM/g
5
10
30
60
120
Minuten

Abbildung 1

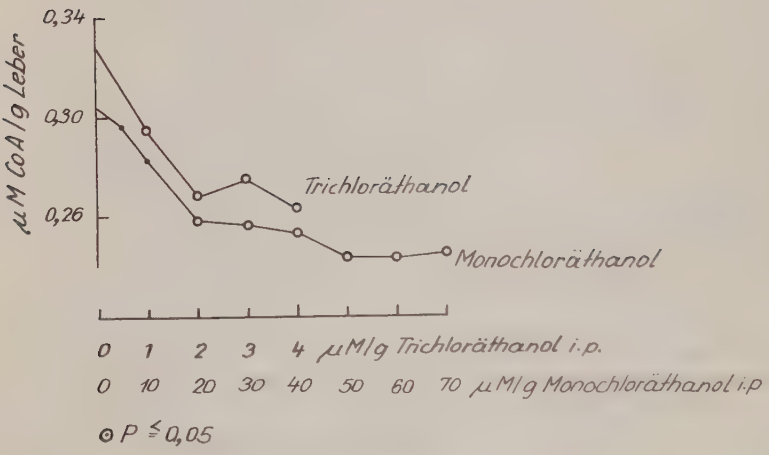
0,34
0,30
0,26
µM CoA/g Leber
Trichloräthanol
Monochloräthanol
0 1 2 3 4 µM/g Trichloräthanol i.p.
0 10 20 30 40 50 60 70 µM/g Monochloräthanol i.p
⊙ P ≤ 0,05

Abbildung 2

Lebenslauf

Am 4.3.1941 wurde ich als erster Sohn des Arztes Wolfgang Fickeis in Duisburg geboren. In Odernheim/Glan war ich von 1947 bis 1951 Schüler der Volksschule. Ab Ostern 1951 besuchte ich das Staatliche Neusprachliche Gymnasium in Sobernheim/Nahe und legte dort am 3.3.1960 die Reifeprüfung ab. An der Universität Erlangen begann ich mit dem Studium der Medizin im Sommersemester 1960. Das Vorphysikum bestand ich im Frühjahr 1961 und das Physikum im Frühjahr 1963. Das Sommersemester 1963 und das Wintersemester 1963/64 verbrachte ich an der Universität Mainz. Vom Sommersemester 1964 bis Wintersemester 1965/66 studierte ich wieder an der Universität Erlangen. Am 11.8.1966 beendete ich vor dem Prüfungsausschuß in Erlangen die ärztliche Prüfung mit dem Urteil "gut". Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistent in der Praxis meines Vaters in Odernheim/Glan.

Georg Fickeis

Offsetdruck - Fotodruck
Josef Hogl
8520 Erlangen, Brüxerstraße 9, (Nähe Röthelheimbad,) Tel. 15336

Offsetdruck - Fotodruck
- J. Hogl, Erlangen, Brüxer Straße 9, (Nähe Rötheimbad) Telefon 15336 -